

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A-33

(11)Publication number : 07-099965

(43)Date of publication of application : 18.04.1995

(51)Int.Cl.

C12N 1/04  
C08B 37/18  
C12N 1/20  
C12N 5/00  
// A61K 35/12  
A61K 35/74  
(C12N 1/20  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:19 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:23 )  
(C12N 5/00  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 05-274827

(71)Applicant : MEIJI SEIKA KAISHA LTD

(22)Date of filing : 07.10.1993

(72)Inventor : MATSUMOTO HITOSHI  
SATO UICHI  
HIRAYAMA MASAO

(54) FREEZING DAMAGE-PROTECTING AGENT AND FREEZING AND STORING METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a freezing damage-protecting agent capable of suppressing hindrance due to freeze and improving survival rate in freezing a cell of a microorganism, a plant or an animal and having its high serviceability in fields of food industry, medicine industry, etc.

CONSTITUTION: This freezing damage-protecting agent for microorganisms or cells contains inulin type fructan as an active ingredient. The method for carrying out freeze storage of a microorganism or a cell is to immerse the microorganism or the cell in a solution containing the inulin type fructan and then freeze or lyophilize the microorganism or the cell.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 03.08.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3509148

[Date of registration] 09.01.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-99965

(43) 公開日 平成7年(1995)4月18日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/04		7236-4B		
C 0 8 B 37/18		7433-4C		
C 1 2 N 1/20	B	7236-4B		
		8412-4B		
			C 1 2 N 5/ 00	D
			(C 1 2 N 5/ 00	D

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-274827

(22) 出願日 平成5年(1993)10月7日

(71) 出願人 000006091

明治製菓株式会社

東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72) 発明者 松本 均

埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓  
株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 佐藤 右一

埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓  
株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 平山 匡男

埼玉県坂戸市千代田5-3-1 明治製菓  
株式会社生物科学研究所内

(74) 代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54) 【発明の名称】 凍害保護剤および凍結保存方法

(57) 【要約】

【構成】 イヌリン型フルクタンを有効成分として含有することを特徴とする微生物または細胞のための凍害保護剤並びにイヌリン型フルクタンを含む溶液中に微生物または細胞を浸した後、凍結または凍結乾燥させることを特徴とする微生物または細胞の凍結保存方法。

【効果】 本発明の凍害保護剤を用いれば、微生物や植物、動物の細胞を凍結する際に、凍結障害を抑制し、その生存率を向上させることができる。したがって、本発明は食品工業、医薬品工業等の分野において有用性が高い。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イヌリン型フルクタンを有効成分として含有することを特徴とする微生物または細胞のための凍害保護剤。

【請求項2】 イヌリン型フルクタンが重合度3～6の混合物である請求項1記載の凍害保護剤。

【請求項3】 イヌリン型フルクタンが重合度3、4および5のいずれかである請求項1記載の凍害保護剤。

【請求項4】 微生物または細胞がビフィズス菌、乳酸菌、大腸菌、枯草菌、酵母または植物、動物の培養細胞である請求項1記載の凍害保護剤。

【請求項5】 イヌリン型フルクタンを含む溶液中に微生物または細胞を浸した後、凍結または凍結乾燥させることを特徴とする微生物または細胞の凍結保存方法。

【請求項6】 イヌリン型フルクタンが重合度3～6である請求項5記載の凍結保存方法。

【請求項7】 イヌリン型フルクタンが重合度3、4および5のいずれかである請求項5記載の凍結保存方法。

【請求項8】 微生物または細胞がビフィズス菌、乳酸菌、大腸菌、枯草菌、酵母または植物、動物の培養細胞である請求項5記載の凍結保存方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、イヌリン型フルクタンを有効成分とする凍害保護剤および凍結保存方法に関する。さらに詳細には、ビフィズス菌、乳酸菌、大腸菌等のような微生物または植物、動物の培養細胞を凍結するときに起こる凍結障害を抑制し、生存率を向上させる凍害保護剤および凍結保存方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】微生物や細胞の貯蔵・保存は単に優れた系統の保存に用いられるのみならず、その利用範囲が拡大しつつある。例えば、微生物では、ビフィズス菌や乳酸菌等は、その凍結乾燥菌体が整腸効果をもつ食品素材として繁用されている。また、特定の遺伝子を導入された大腸菌等の保存は遺伝子工学上重要な課題となっている。

【0003】一般に、微生物や細胞などの生体液の長期貯蔵・保存のために凍結保存が行われている。従来、このような凍結保存においては、生理学的に受容可能な凍害保護剤で希釈した後、凍結貯蔵・保存する方法が殆どである。しかしながら、凍結は生物にとって苛酷であり、凍結および融解工程で生ずる熱的衝撃や結晶生成のために、その生存率を低下させることが多い。従って、凍結保存後の生存率をより高める凍害保護剤と凍結保存方法の開発が切望されていた。

【0004】微生物や細胞の凍害を抑制するために、生理的に受容可能な保護剤で希釈する方法が検討され、グリセロールが有効であることが見出された(Polge, ネイチャー(Nature), 164巻, 666頁, 1949

年]。その後も凍害を抑制するための保護剤の開発が行われている。例えば、ビフィズス菌や乳酸菌の凍結乾燥製剤化において、生存率を向上させるために添加する保護剤としてラクチュロース(特開昭52-151787号公報)、ビタミンE類(特公昭53-5747号公報)、コーンステープリカー(特開昭58-104787号公報)、生澱粉(特開昭58-149675号公報)およびサイクロデキストリン(特開昭63-251080号公報)を用いる方法が知られている。しかし、これらの方法は、該保護剤を大量に使用するにはその物質が高価であったり、嗜好性が好ましくない等の問題点があった。また、動物細胞を凍結保存する場合、その凍結培地中に血清の添加を必要とするか、あるいは血清の代わりに保護剤として、メチルセルロースやトレハロース(特平4-501112号公報)あるいはトレハロースとゼラチン(特開平5-7489号公報)を添加する方法も確立されている。しかしながら、これらの方法も生存率の向上が課題となっている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは凍結過程における微生物や細胞の死滅を抑制するため種々検討した結果、イヌリン型フルクタンを希釈液中の凍害保護剤として使用することにより、凍結保存時または凍結乾燥時においても微生物や細胞の死滅を著しく抑制できることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】本発明は、イヌリン型フルクタンを有効成分として含有することを特徴とする微生物または細胞のための凍害保護剤並びにイヌリン型フルクタンを含む溶液中に微生物または細胞を浸した後、凍結または凍結乾燥させることを特徴とする微生物または細胞の凍結保存方法を提供するものである。

【0007】本発明が適用される微生物としては各種のものがあり、例えばビフィドバクテリウム・アドレンセンテス、ビフィドバクテリウム・インファンテス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ等のビフィズス菌、ストレプトコッカス・フェーカリス、ラクトバチルス・アシドフィラス等の乳酸菌、エッシャーリア・コリK-12のような大腸菌、バチルス・ズブチリス・マルブルグ168株のような枯草菌、サッカロミセス・セレビシェのような酵母を挙げることができる。

【0008】また、動物細胞としては、ヒト、牛、馬、山羊、羊、兎、ハムスター、ラット、マウスの胚、癌細胞、T-cel1白血病細胞、ハイブリドーマ、繊維芽細胞、血管構成細胞、骨髄細胞、分散脾島細胞、魚類の培養細胞等が挙げられる。植物細胞としては、イネ、コムギ、ニチニチソウ、トウモロコシ、サトウキビ、タバコ、ラベンダー、リンゴ、ニンジン、ダイズ、ゼニゴケ、イチゴ、バレイショ、カーネーション、エンドウ、アスパラガス、メキャベツ、ナシ等の培養細胞やプロト

プラスト、莖頂および不定胚などを挙げることができる。

【0009】微生物は任意の培地で培養した後、遠心分離等により集菌し、適当な洗浄液で洗浄を行った湿菌体を利用され、細胞は振盪培養などの任意の方法で培養した細胞を用いることができる。得られた微生物または細胞は、そのままもしくは少量の緩衝液を加えた懸濁液として用い、予め殺菌したイヌリン型フルクタンを含む希釈液中に懸濁させる。

【0010】希釈液の成分はイヌリン型フルクタンを有効成分として含み、他の成分としてはスキムミルク、ジメチルスルフォキシド、グリセリン、ブドウ糖、ショ糖、乳糖、ビタミン類などを単独で、もしくは適宜組み合わせ、必要に応じて同時にまたは付加的に添加して用いることができる。

【0011】本発明に用いられるイヌリン型フルクタンの濃度は、凍結する微生物や細胞に適した濃度で使用すればよく、好ましくは1~40重量%の範囲で用いる。また、本発明のイヌリン型フルクタンは、凍害保護剤の組成の一部または全部として使用することができる。イヌリン型フルクタンはショ糖にフルクトースが直鎖的に結合している重合度3以上のフルクタンであり、通常は重合度3~15、好ましくは重合度3~6のものが単独で、あるいは2種以上の混合物として使用される。

【0012】これらのイヌリン型フルクタンまたはその混合物は、チョコレートやクイモ等から抽出することにより、あるいはショ糖にフルクトース転移能力を持つ酵素を作用させることにより得ることができる。具体的なイヌリン型フルクタンを例示すると以下のものが挙げられるが、本発明はこれらに限定されるものではない。例えばクイモの抽出により得られるイヌリン型フルクタンは、重合度3~6のもの(30~50重量%)、重合度7以上のもの(20~50重量%)、単糖および2糖(10~30重量%)の糖組成を有し、ショ糖にアスペルギルス・ニガー由来の酵素を作用させて得られるイヌリン型フルクタン(商品名:メイオリゴG;明治製菓社製)は重合度3~6のもの(55~60重量%)、単糖および2糖(40~45重量%)の糖組成を有する。さらに、上記混合物をカラムクロマトグラフィーまたは膜等を用いて部分精製することにより重合度3~6の糖を主成分とするフルクタン混合物を得ることができる。例えば上記メイオリゴGをカラムクロマトグラフィーを用いて部分精製することにより重合度3~6のものを95重量%以上の割合で含有するイヌリン型フルクタン(商品名:メイオリゴP)を得ることができ、クイモ抽出物からも重合度3~6(70重量%以上)のイヌリン型フルクタンを得ることができる。さらに、カラムクロマトグラフィーや晶析等を組み合わせることにより、単一重合度を主成分とするイヌリン型フルクタン、例えば重合度4(ニストース)、重合度5(フラクトシルニスト

ース)を得ることができる。

【0013】イヌリン型フルクタンを有効成分として含有することを特徴とする微生物または細胞のための本発明凍害保護剤は、従来知られている有効成分を含む既知凍害保護剤に比べて、凍結保存後に微生物や細胞が生き残る比率(生存率)の大幅な向上を示しており、微生物または細胞の凍結過程における死滅を有効に防止することができる。

【0014】

【実施例】次に、本発明の実施例を示すが、これはあくまでも例示であって、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例1

ビフィズス菌(ビフィドバクテリウム・ロンガム)をBL培地で37℃、24時間嫌気培養し、培養後直ちに遠心分離により培養液より菌体を分離した。集菌した菌体を嫌気性リン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄し、これを再び遠心分離、集菌した。得られた湿菌体を等量3分し、以下の実験に供した。

(イ)得られた湿菌体をニストース(重合度4のイヌリン型フルクタン)6.7重量%のみを含む希釈液に均一に懸濁させた後、-25℃で凍結させ、24時間保存後、凍結・融解(-25℃で凍結、30℃で急速融解)を3回繰り返した。その結果、凍結保存菌の生菌数は $2.08 \times 10^8$ /mlで、生存率は41.6%であった。

【0015】(ロ)クイモより抽出したイヌリン型フルクタン(組成:重合度3~10のもの52%、重合度11以上のもの34%)6.7重量%のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させた後、前記(イ)と同様の操作を行った。その結果、凍結保存菌の生菌数は $1.25 \times 10^8$ /mlで、生存率は25.5%であった。

(ハ)対照例としてショ糖6.7重量%(モル濃度0.1M)のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させた後、前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結保存菌の生菌数は $6.30 \times 10^7$ /mlで、生存率は12.9%であった。

#### 【0016】実施例2

ビフィズス菌(ビフィドバクテリウム・アドレスセンテス)をBL培地で37℃、24時間嫌気培養し、培養後直ちに遠心分離により培養液より菌体を分離した。集菌した菌体を嫌気性リン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄し、これを再び遠心分離、集菌した。得られた湿菌体を等量4分し、以下の実験に供した。

(イ)得られた湿菌体を、ニストース(重合度4のイヌリン型フルクタン)3重量%およびスキムミルク10重量%を含む希釈液に重量比1:1で混合し、pH7.0(5規定水酸化ナトリウム溶液)に調整した。混合液をシャーレに分注し、-20℃で凍結乾燥した。凍結乾燥後の生菌数は $1.18 \times 10^{11}$ /gであり、生存率は33.5%であった。

【0017】(ロ) イヌリン型フルクタン混合物であるメイオリゴP (商品名、明治製菓社製、組成: 重合度3のもの44.4%、重合度4のもの42.9%、重合度5のもの8.9%、重合度6のもの0.6%) 3重量%およびスキムミルク10重量%を含む希釈液と湿菌体を重量比1:1で混合した後、前記(イ)と同様の操作を行った。凍結乾燥後の生菌数は $1.08 \times 10^{11}$ /gであり、生存率は30.6%であった。

(ハ) フラクトシルニストース (重合度5のイヌリン型フルクタン) 3重量%およびスキムミルク10重量%を含む希釈液と湿菌体を重量比1:1で混合した後、前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結乾燥後の生菌数は $1.09 \times 10^{11}$ /gであり、生存率は30.8%であった。

(ニ) 対照例として乳糖3重量%およびスキムミルク10重量%を含む希釈液に湿菌体を重量比1:1で混合した後、前記(イ)と同様の操作を行った。その結果、凍結乾燥後の生菌数は $5.88 \times 10^{10}$ /gであり、生存率は16.7%であった。

#### 【0018】実施例3

大腸菌 (エッシャーリシア・コリK-12) をLブロスで37℃、24時間培養し、培養後直ちに遠心分離により培養液より菌体を分離した。集菌した菌体をリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、これを再び遠心分離、集菌した。得られた湿菌体を等量3分し、以下の実験に供した。

(イ) 得られた湿菌体をニストース (重合度4のイヌリン型フルクタン) 10重量%のみを含む希釈液に均一に懸濁し、-25℃で凍結した。24時間保存後、凍結・融解 (-25℃で凍結、30℃で急速融解) を3回繰り返した。その結果、凍結保存菌の生菌数は $3.99 \times 10^8$ /mlで生存率は41.6%であった。

【0019】(ロ) 1-kestose (重合度3のイヌリン型フルクタン) 10重量%のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させ、前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結保存菌の生菌数は $2.47 \times 10^8$ /mlで、生存率は25.8%であった。

(ハ) 対照例としてトレハロース10重量%のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させ、前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結保存菌の生菌数は $1.86 \times 10^8$ /mlで生存率は20.2%であった。

(ニ) 対照例としてショ糖10重量%のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させ、前記(イ)と同様の操作を行った。その結果、凍結保存菌は生菌数 $1.77 \times 10^8$ /mlで生存率は18.3%であった。

#### 【0020】実施例4

乳酸菌 (ラクトバチルス・アシドフィラス) をILS培地で37℃、24時間培養し、培養後直ちに遠心分離によって培養液より菌体を分離した。集菌した菌体をリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄し、これを再び遠心分離、集

菌した。得られた湿菌体を等量2分し、以下の実験に供した。

【0021】(イ) 湿菌体をニストース (重合度4のイヌリン型フルクタン) 6.7重量%のみを含む希釈液に均一に懸濁し、-25℃で凍結した。24時間保存後、凍結・融解 (-25℃で凍結、30℃で急速融解) を3回繰り返した。凍結保存菌の生菌数は $4.0 \times 10^8$ /mlで生存率は47.6%であった。

(ロ) 対照例としてショ糖6.7重量%のみを含む希釈液に湿菌体を均一に懸濁させ、前記(イ)と同様の操作を行った。その結果、凍結保存菌の生菌数は $1.32 \times 10^8$ /mlで生存率は15.7%であった。

#### 【0022】実施例5

培養細胞として癌細胞由来のHeLa細胞を用い、10%牛胎児血清を添加したMEM培地で37℃で培養した後、0.25%トリプシン液で処理して細胞を剥した。これを遠心管に入れ、500~600rpmで5~10分間遠心して細胞を採集した。得られた細胞を等量3分し、以下の実験に供した。

(イ) ニストース (重合度4のイヌリン型フルクタン) を最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。冷温状態で、凍結用培地に細胞を加えて懸濁し1~2時間静置し、凍害保護剤を細胞内に浸透させた後、アンプルに封入した。このアンプルを-80℃で凍結し9日間保存した。37℃の恒温槽で融解後、増殖培地で10~20倍程度希釈し、500~600rpmで5~10分間遠心して細胞を採集した。融解した細胞は、トリパンブルー染色を用いて生死を確認し、生存率を算出した結果93%生存していた。

【0023】(ロ) 対照例としてグリセリンを最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は65%であった。

(ハ) 対照例としてグルコースを最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は62%であった。

#### 【0024】実施例6

培養細胞としてチャイニーズハムスター卵巣由来のCHO-K1細胞を用い、10%牛胎児血清を添加したHam's F12培地にて37℃で培養した後、0.25%トリプシン液で処理して細胞を剥した。これを遠心管に入れ、500~600rpmで5~10分間遠心して細胞を採集した。得られた細胞を等量3分し以下の実験に供した。

(イ) ニストース (重合度4のイヌリン型フルクタン) を最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地

10

20

30

40

50

に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。冷温状態で、凍結用培地に細胞を加えて懸濁し1~2時間静置し、凍害保護剤を細胞内に浸透させた後、アンプルに封入した。このアンプルを-80℃で凍結し9日間保存した。37℃の恒温槽で融解後、増殖培地で10~20倍程度希釈し、500~600rpmで5~10分間遠心して細胞を採集した。融解した細胞は、トリパンブルー染色を用いて生死を確認し、生存率を算出した結果、88%生存していた。

【0025】(ロ) 対照例としてグリセリンを最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は61%であった。

(ハ) 対照例としてグルコースを最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は48%であった。

(ニ) 対照例としてジメチルスルフォキシドを最終濃度10重量%になるように血清を含む増殖培地に加えてよく攪拌して凍結用培地を調製した。これを前記(イ)と同様の操作を行った。その結果、凍結・融解後の生存率は78%であった。

#### 【0026】実施例7

ニンジンの胚軸由来のカルスを適当な任意の液体培地で培養し、0.7Mマンニトール中でメイセラゼP-1(商品名、明治製菓社製)で処理し、濾過・遠心・洗浄し、プロトプラスト懸濁液を得た。得られたプロトプラストを等量3分以下の実験に供した。

\* 30

\* (イ) ニストース(重合度4のイヌリン型フルクタン)を最終濃度20重量%、ジメチルスルフォキシドを最終濃度10%になるよう上記培地に加えてよく攪拌して濾過・滅菌して凍結用培地とした。プロトプラスト懸濁液に冷温状態で、この凍結用培地を少量ずつ穏やかに攪拌しながら加えた。30分~1時間程度静置し、凍害保護剤をプロトプラスト内に浸透させた後、液体窒素中-196℃で凍結し9日間保存した。37℃の恒温槽で急速融解後、氷中で0.4Mマンニトールを含む液体培地で希釈し、遠心してプロトプラストを採集した。融解したプロトプラストは、エバンズブルー染色を用いて生死を確認し、生存率を算出した結果52%生存していた。

【0027】(ロ) 対照例としてグルコースを最終濃度20重量%、ジメチルスルフォキシドを最終濃度10%になるよう上記培地に加えてよく攪拌して濾過・滅菌し、凍結用培地とした。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は42%であった。

(ハ) 対照例としてシュクロースを最終濃度20重量%、ジメチルスルフォキシドを最終濃度10%になるよう上記培地に加えてよく攪拌して濾過・滅菌し、凍結用培地とした。これを前記(イ)と同様の操作を行ったところ、凍結・融解後の生存率は28%であった。

#### 【0028】

【発明の効果】本発明の凍害保護剤を用いれば、微生物や植物、動物の細胞を凍結する際に、凍結障害を抑制し、その生存率を向上させることができる。したがって、本発明は食品工業、医薬品工業等の分野において有用性が高い。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/00				
// A 6 1 K 35/12		7431-4C		
35/74		Z 7431-4C		
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:23)				
(C 1 2 N 5/00				
C 1 2 R 1:91)				

C 1 2 R 1:91)